31971L0393

20.12.1971 *ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ* L 279/7

DRUHÁ SMĚRNICE KOMISE
ze dne 18. listopadu 1971,
kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(71/393/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady ze dne 20. července 1970 o zavedení společného systému odběru vzorků a analytických metod pro úřední kontrolu krmiv ([1]), a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že výše uvedená směrnice stanoví, že úřední kontroly krmiv ke zjištění, zda jsou splněny požadavky stanovené právními a správními předpisy ohledně jakosti a složení krmiv, se provádějí podle společného systému odběru vzorků a analytických metod;

vzhledem k tomu, že směrnice Komise č. 71/250/EHS ze dne 15. června 1971 ([2]) již stanovila řadu analytických metod; že podle stavu doposud provedených prací je však nutno stanovit druhou sérii analytických metod;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontrolu krmiv ohledně obsahu vlhkosti, dusíkatých sloučenin, celkového fosforu a tuku budou prováděny podle metod, které jsou uvedeny v příloze této směrnice.

Všeobecné podmínky části 1 (úvod) přílohy k první směrnici Komise č. 71/250/EHS ze dne 15. července 1971, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv se použijí pro metody uvedené v příloze této směrnice.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do dne 1. ledna 1973. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 18. listopadu 1971.

Za Komisi

předseda

Franco M. MALFATTI

([1]) Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) Úř. věst. L 155, 12.7.1971, s. 13.

PŘÍLOHA

I. STANOVENÍ OBSAHU VLHKOSTI

1. Účel a rozsah

Metoda umožňuje stanovení obsahu vlhkosti v krmivech. Nevztahuje se na stanovení vlhkosti mléčných výrobků jako krmných surovin, minerálních látek a směsí, které se skládají převážně z minerálních látek, jakož i olejnatých semen a olejnin ve smyslu nařízení Rady č. 136/66/EHS ze dne 22. září 1966 o zřízení společné organizace trhu s oleji a tuky ([1]).

Metoda, kterou se stanoví obsah vlhkosti v olejnatých semenech a olejninách, je stanovena v příloze III nařízení Komise č. 1470/68 ze dne 23. září 1968 o odběru a úpravě vzorků, jakož i o určování obsahu oleje, cizích příměsí a vlhkosti v olejnatých semenech ([2]).

2. Princip

Vzorek se suší za předepsaných podmínek, které závisejí na druhu krmiva. Zjišťuje se úbytek hmotnosti. U pevných krmiv s vysokým obsahem vlhkostí je nutné provést předsoušení.

3. Přístroje

3.1 Laboratorní mlýnek z materiálu, který neabsorbuje vlhkost, snadno se čistí, umožňuje rychlé a rovnoměrné rozemletí, aniž by došlo ke znatelnému ohřevu, pokud možno zabraňuje kontaktu s venkovním vzduchem a který odpovídá požadavkům uvedeným v bodech 4.1.1 a 4.1.2 (např. úderové křížové mikromlýnky, vodou chlazené mikromlýnky, rozebíratelné kuželové mlýnky, kuželové mlýnky s pomalým chodem a drtiče na principu mixeru).

3.2 Analytická váha s přesností 0,5 mg.

3.3 Vysoušečky z nekorodujícího kovu nebo ze skla, se vzduchotěsně uzavíratelnými víčky; užitková plocha musí umožňovat rozprostřít 0,3 g vzorku na 1 cm^2.

3.4 Elektrická laboratorní sušárna (± 1 °C), která zaručí rychlou regulaci teploty a která je vybavena kvalitním větráním ([3]).

3.5 Elektrická vakuová laboratorní sušárna s regulací teploty a s olejovým čerpadlem, která je vybavena buď zařízením pro přívod teplého a suchého vzduchu, nebo vysoušecím prostředkem (např. oxid vápenatý).

3.6 Exsikátor se silnou perforovanou deskou z kovu nebo porcelánu, který obsahuje účinný vysoušecí prostředek.

4. Postup

NB: Postupy, které jsou popsány v tomto oddílu, musí být provedeny ihned po otevření obalů, které obsahují vzorky. Stanovení je nutno opakovat alespoň dvakrát.

4.1 *Příprava*

4.1.1 *Krmiva mimo krmiv uvedených v bodech 4.1.2 a 4.1.3.*

Odebere se minimálně 50 g vzorku a, pokud je to nutné, vzorek serozemele takovým způsobem, aby nedošlo ke změně obsahu vlhkosti (viz bod 6).

4.1.2 *Obiloviny a krupky*

Odebere se minimálně 50 g vzorku. Toto množství se umele tak, aby alespoň 50 % částic prošlo sítem o velikosti oka 0,5 mm a zbytek na sítě s kulatými oky velikosti 1 mm byl maximálně 10 %.

([1]) Úř. věst. L 127, 30.9.1966, s. 3025/66.
([2]) Úř. věst. L 239, 28.9.1968, s. 2.
([3]) Laboratorní sušárna určená pro sušení obilí, mouky, krup a krupice má mít takovou tepelnou kapacitu, aby, pokud je nastavena na teplotu 131 °C, této teploty opět dosáhla v době kratší než 45 minut, když je do sušárny současně umístěn maximální počet vzorků, které se mají sušit.Větrání má být takové, že když všechny vzorky měkké pšenice, které může sušárna obsahovat, se současně suší po dobu dvou hodin, vykazují s ohledem na výsledky čtyřhodinového sušení rozdíl, který je nižší než 0,15 %.

4.1.3 *Tekutá nebo pastovitá krmiva; krmiva, která jsou složena převážně z tuků*

Odebere se 25 g vzorku s přesností na 10 mg, smíchá se s odpovídajícím množstvím předem vysušeného písku zváženého s přesností na 10 mg, až vznikne homogenní hmota.

4.2 *Sušení*

4.2.1 *Krmiva mimo krmiv uvedených v bodech 4.2.2 a 4.2.3*

Vysoušečka s víčkem (3.3) se zváží s přesností na 0,5 mg. Do předem zvážené vysoušečky se naváží asi 5 g vzorku, váženo s přesností na 1 mg, a rovnoměrně se rozprostře Vysoušečka se po sejmutí víčka umístí do laboratorní sušárny předehřáté na 103 °C. Aby se zabránilo příliš velkému poklesu teploty, je třeba vkládat vysoušečky do sušárny co nejrychleji. Sušení probíhá 4 hodiny, přičemž doba sušení se počítá od okamžiku, kdy teplota v laboratorní sušárně opět dosáhla 103 °C. Potom se vysoušečka uzavře víčkem, vyjme ze sušárny a nechá vychladnout 30 až 45 minut v exsikátoru a nakonec se zváží s přesností na 1 mg.

U vzorků, které se skládají převážně z tuku, se suší ještě dalších 30 minut při teplotě 103 °C a znovu se zváží. Rozdíl mezi těmito dvěma váženími nesmí být více než 0,1 %.

4.2.2 *Obiloviny, mouka, kroupy a krupice*

Vysoušečka s víčkem (3.3) se zváží s přesností na 0,5 mg. Do předem zvážené vysoušečky se naváží asi 5 g vzorku váženo s přesností na 1 mg a rovnoměrně rozprostře. Vysoušečka se po sejmutí víčka umístí do laboratorní sušárny předehřáté na 130 °C. Aby pokles teploty laboratorní sušárny nebyl příliš rychlý, je nutno vysoušečku do sušárny umístit co nejrychleji. Sušení probíhá 2 hodiny, přičemž doba sušení se počítá od okamžiku, kdy teplota v laboratorní sušárně opět dosáhla 130 °C. Po otevření sušárny se vysoušečka ihned uzavře víčkem, vyjme ze sušárny, nechá vychladnout 30 až 45 minut v exsikátoru (3.6) a nakonec se zváží s přesností na 1 mg.

4.2.3 *Krmné směsi s obsahem sacharosy nebo laktosy vyšším než 4 %, a krmné suroviny jako: šrot ze svatojánského chleba, hydrolyzované vedlejší výrobky z obilovin, sladový květ, cukrovarnické řízky, rybí vývar, cukr a krmné směsi s více než 25 % minerálních látek obsahujících krystalickou vodu.*

Vysoušečka s víčkem (3.3) se zváží s přesností na 0,5 mg. Do předem zvážené vysoušečky se naváží asi 5 g vzorku váženo s přesností na 1 mg a rovnoměrně se rozprostře. Vysoušečka se po sejmutí víčka umístí do laboratorní vakuové sušárny (3.5) předehřáté na 80 až 85 °C. Aby pokles teploty v laboratorní sušárně nebyl příliš rychlý, je nutno nádobu do sušárny umístit co možno nejrychleji.

Tlak se upraví na 100 torrů a vzorek se suší při tomto tlaku 4 hodiny buď pomocí přívodu horkého a suchého vzduchu, nebo pomocí vysoušecího prostředku (přibližně 300 g na 20 vzorků). V posledním případě se přeruší spojení s vakuovou pumpou, jakmile je dosaženo předepsaného tlaku. Doba sušení se počítá od okamžiku, kdy bylo v laboratorní sušárně opět dosaženo teploty 80 až 85 °C. Po uplynutí doby sušení se tlak v sušárně opatrně upraví na atmosférický. Po otevření vakuové laboratorní sušárny se vysoušečka ihned uzavře víčkem, vyjme ze sušárny, nechá vychladnout 30 až 45 minut v exsikátoru (3.6) a nakonec se zváží s přesností na 1 mg. Vysoušečka se suší dalších 30 minut ve vakuové laboratorní sušárně při teplotě 80 až 85 °C a znovu se zváží. Rozdíl mezi těmito dvěma váženími nesmí být více než 0,1 %.

4.3 *Předsoušení*

4.3.1 *Krmiva mimo krmiv uvedených v bodě 4.3.2*

Pevná krmiva s vysokým obsahem vlhkosti, která způsobuje obtíže při mletí, se musí předsoušet být provedeno tímto způsobem:

Naváží se 50 g nerozemletého vzorku s přesností na 10 mg (hrubé rozemletí se provádí u lisovaných krmiv nebo u krmiv v kusech, pokud je to nutné) do vhodné nádoby (např. hliníková miska 20 x 12 cm s okrajem 0,5 cm). Suší se v laboratorní sušárně při teplotě 60 až 70 °C až do snížení obsahu vlhkosti na hodnotu mezi 8 a 12 %. Vysoušečka se vyjme ze sušárny, nechá se 1 hodinu volně chladit a pak se zváží s přesností na 10 mg. Podle druhu krmiva se pak rozemele způsobem uvedeným v bodě 4.1.1 a suší způsobem uvedeným v bodě 4.2.1 nebo 4.2.3.

4.3.2 *Obiloviny*

Zrna, jejichž vlhkost je vyšší než 17 %, se musí předsoušet takto:

Do vhodné nádoby (např. hliníková miska 20 x 12 cm s okrajem 0,5 cm) se naváží50 g *nerozemletých* zrn s přesností na 10 mg, suší se v laboratorní sušárně po dobu 5 až 7 minut při teplotě 130 °C. Vyjme se ze sušárny a nechá se 2 hodiny volně chladit a pak se zváží s přesností na 10 mg. Pak se ihned rozemele způsobem uvedeným v bodě 4.1.2 a suší způsobem uvedeným v bodě 4.2.2.

5. **Výpočet výsledků**

Obsah vlhkosti vzorku v procentech se vypočte podlenásledujícího vzorce:

5.1 *Sušení bez předsoušení*

$$(E-m)\times\frac{100}{E}$$

kde

E = počáteční hmotnost vzorku v gramech,

m = hmotnost sušeného vzorku v gramech.

5.2 *Sušení s předsušením*

$$\left[\frac{(M'-m)M}{M'}+E-M\right]\times\frac{100}{E}=100\left(1-\frac{Mm}{EM'}\right)$$

kde

E = počáteční hmotnost vzorku v gramech,

M = hmotnost vzorku po předsušení,

M' = hmotnost vzorku po rozemletí a rozemletí,

m = hmotnost sušeného vzorku v gramech.

5.3 *Opakovatelnost*

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními obsahu vlhkosti prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu 0,2 %.

6. **Poznámka**

Pokud je nutné provést rozemletí vzorku a pokud se na základě toho musí počítat se změnou obsahu vlhkosti materiálu, je nutno přepočítat výsledky stanovení ostatních složek na obsah vlhkosti původního vzorku.

II. STANOVENÍ TĚKAVÝCH DUSÍKATÝCH LÁTEK

A. MIKRODIFUZE

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovit obsah těkavých dusíkatých látek, vyjádřených jako čpavek, v krmivech.

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje vodou, roztok se vyčiří a zfiltruje se. Těkavé dusíkaté báze se po přidání roztoku uhličitanu draselného vytěsní a mikrodifuzí se zachycují se v roztoku kyseliny borité a titrují se kyselinou sírovou.

3. **Chemikálie**

3.1 20 % (w/v) roztok kyseliny trichloroctové;

3.2 Indikátor: 33 mg bromkrezolové zeleně a 65 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml 95 až 96 %(v/v) ethanolu.

3.3 Roztok kyseliny borité: v odměrné baňce o objemu 1 l se rozpustí 10 g kyseliny borité v 200 ml 95 až 96 % (v/v) ethanolu a 700 ml vody. Přidá se 10 ml indikátoru (3.2). Roztok se promíchá a v případě potřeby se přidá roztok hydroxidu sodného, až má roztok světle červenou barvu. 1 ml tohoto roztoku může vázat až 300 µg NH_3.

3.4 Nasycený roztok uhličitanu draselného: 100 g uhličitanu draselného p.a. se rozpustí ve 100 ml vroucí vody; po ochlazení se roztok filtruje.

3.5 Kyselina sírová 0,02 N.

4. **Přístroje**

4.1 Mixér (míchadlo): přibližně 35 až 40 otáček/min.

4.2 Skleněné nebo plastové Conwayovy misky (srovnej skicu) ze skla nebo plastu.

4.3 Mikrobyrety s dělením 1/100 ml.

5. **Postup**

Do 200 ml odměrné baňky se naváží 10 g vzorku s přesností na 1 mg, přidá se 100 ml vody a míchá se 30 minut v mixeru nebo pomocí míchadla. Pak se přidá 50 ml kyseliny trichloroctové (3.1), doplní vodou po značku, důkladně se protřepe a přefiltruje přes skládaný filtr.

Na střed Conwayovy misky se napipetuje 1 ml roztoku kyseliny borité (3.3), okolo ní po obvodu misky se napipetuje 1 ml přefiltrovaného vzorku. Miska se částečné zakryje víkem, potřeným tukem, pak se rychle přidá 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu draselného (3.4) na obvod misky a miska se vzduchotěsně uzavře. Aby s jistotou došlo ke smíchání reagenčních činidel, je nutno miskou opatrně otáčet ve vodorovné poloze. Pak se nechá směs stát minimálně 4 hodiny při laboratorní teplotě nebo 1 hodinu při teplotě 40 °C.

Těkavé dusíkaté báze v kyselině borité se pak titrují 0,02 N kyselinou sírovou (3.3) pomocí mikrobyrety (4.3).

Stejným způsobem se provede slepý pokus bez zkoušeného vzorku.

6. **Výpočet výsledků**

1 ml 0,02 N kyseliny sírové odpovídá 0,34 mg amoniaku.

Výsledek se vyjadřuje v procentech.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí přesáhnout:

10 % relat. při obsahu amoniaku nižším než 1 %;

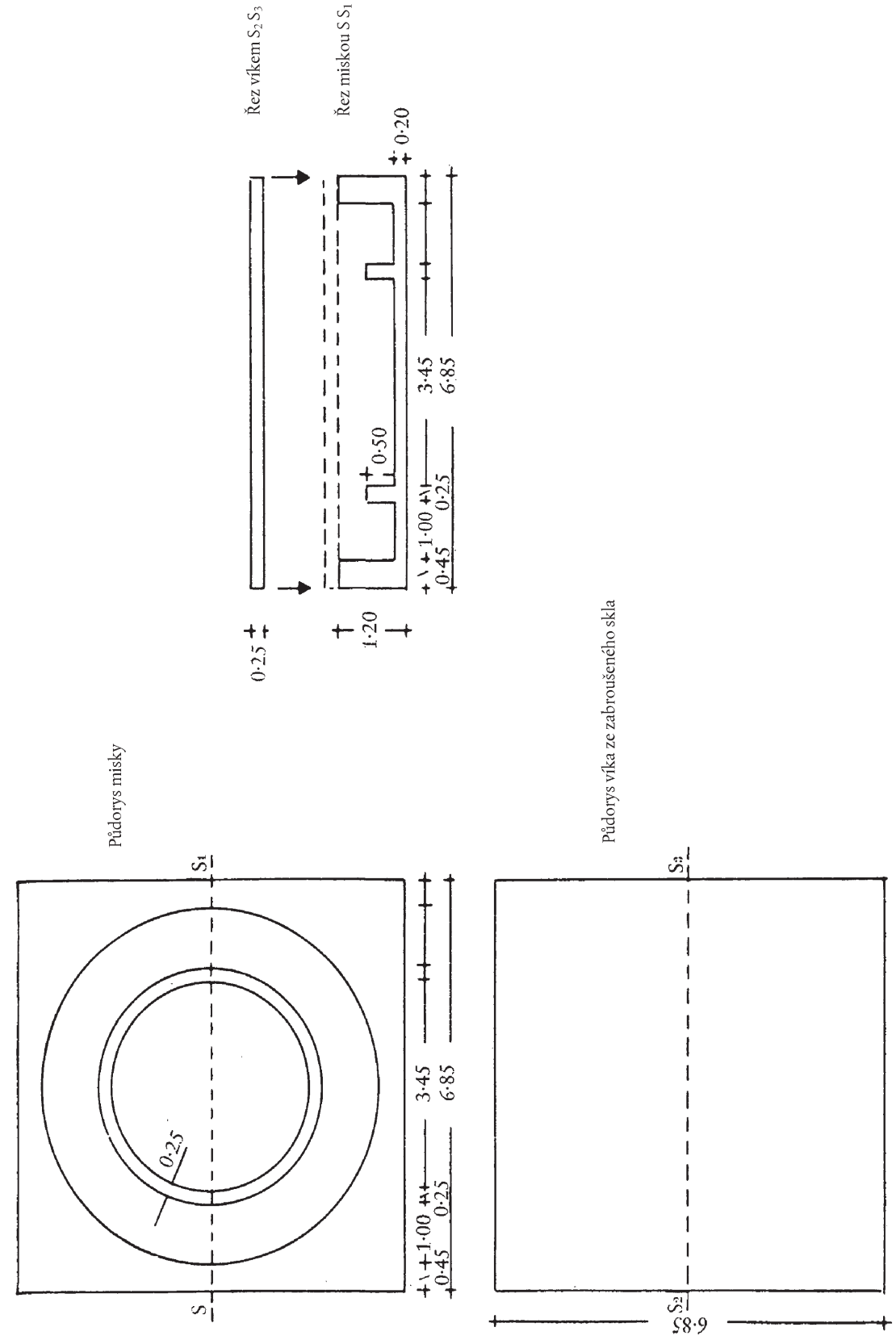
0,1 % abs. při obsahu amoniaku 1 % nebo vyšším.

7. **Poznámka**

Obsahuje-li vzorek více než 0,6 % amoniaku, je nutno původní filtrát zředit.

CONWAYOVA MISKA

Měřítko 1/1



B. DESTILACE

1. **Účel a rozsah**

Metoda umožňuje stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek, vyjádřených jako amoniak, v rybí moučce, která neobsahuje prakticky žádnou močovinu. Metoda je použitelná pouze u obsahů nižších než 0,25 % amoniaku.

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje vodou, roztok se vyčiří a zfiltruje se. Těkavé dusíkaté báze se vytěsní za varu po přidání oxidu hořečnatého a zachycují se v předepsaném množství kyseliny sírové. Přebytek kyseliny sírové se titruje roztokem hydroxidu sodného.

3. **Chemikálie**

3.1 20 % (w/v) roztok kyseliny trichloroctové.

3.2 Oxid hořečnatý p.a.

3.3 Odpěňovací emulze (např. silikonový olej).

3.4 Kyselina sírová 0,1 N.

3.5 Roztok hydroxidu sodného 0,1 N.

3.6 0,3 % (w/v) roztok methylčerveně v 95 - 96 % (v/v) ethanolu.

4. **Přístroje**

4.1 Mixer nebo míchadlo, přibližně 35 až 40 otáček/minutu.

4.2 Kjeldahlova destilační aparatura.

5. **Postup**

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 10 g vzorku s přesností na 1 mg, přidá se 100 ml vody a míchá se 30 minut v mixeru nebo pomocí míchadla. Pak se přidá 50 ml kyseliny trichloroctové (3.1), doplní vodou po značku, důkladně se protřepe a přefiltruje přes skládaný filtr.

Podle předpokládaného obsahu těkavých dusíkatých bází se odpipetuje odpovídající množství čirého filtrátu (obvykle 100 ml), zředí na 200 ml a přidají se 2 g oxidu hořečnatého a několik kapek odpěňovací emulze (3.3). Roztok musí na lakmusový papírek reagovat alkalicky; v opačném případě je nutno ještě přidat oxid hořečnatý. V Kjehldahlově destilačním přístroji se vydestiluje asi 150 ml destilátu, který se jímá do Erlenmeyerovy baňky s přesně odměřeným objemem (25 – 50 ml) 0,1N kyseliny sírové. Při destilaci je nutno zamezit přehřátí stěn destilační baňky. Roztok kyseliny sírové se povaří 2 minuty, pak se ochladí; přebytek kyseliny sírové se titruje 0,1N roztokem hydroxidu sodného (3.5), do něhož se přidá methylčerveň (3.6) jako indikátor.

Stejným způsobem se provádí slepý pokus bez zkoušeného vzorku.

6. **Výpočet výsledků**

1 ml 0,1N kyseliny sírové odpovídá hodnotě 1,7 mg amoniaku.

Výsledek se vyjadřuje v procentech.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu 10 % relat.

III. **STANOVENÍ CELKOVÉHO FOSFORU**

FOTOMETRICKÁ METODA

1. **Účel a rozsah**

Metoda umožňuje stanovení obsahu celkového fosforu v krmivech. Je vhodná především pro zkoušení krmiv s nízkým obsahem fosforu. V určitých případech (výrobky s vysokým obsahem fosforu) je možno použít gravimetrické metody.

2. **Princip**

Vzorek se mineralizuje buď suchou cestou (zvláště u organických krmiv), nebo mokrou cestou (zvláště u minerálních sloučenin a tekutých krmiv), a tak se převede do kyselého roztoku. K tomuto roztoku se přidá molybdátovanadátové činidlo. Extinkce žlutě zbarveného roztoku se měří při 430 nm pomocí spektrofotometru.

3. **Chemikálie**

3.1 Uhličitan vápenatý p.a.,

3.2 Kyselina chlorovodíkováp.a., ρ: 1,1 (přibližně 6 N),

3.3 Kyselina dusičná p.a., ρ: 1,045,

3.4 Kyselina dusičná p.a., ρ: 1,38 až 1,42,

3.5 Kyselina sírová p.a., ρ: 1,84.

3.6 Molybdátovanadátové činidlo: V odměrné baňce o objemu 1 l se smíchá 200 ml roztoku heptamolybdenanu amonného (3.6.1) s 200 ml roztoku vanadičnanu amonného (3.6.2) a s 134 ml kyseliny dusičné (3.4) a doplní se vodu po značku.

3.6.1 Roztok heptamolybdenanu amonného: 100 g heptamolybdenanu amonného p.a.,

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.{}^4H_2O$. se rozpustí v horké vodě. Přidá se 10 ml amoniaku (ρ: 0,91) a objem se doplní vodou na 1 l.

3.6.2 Roztok vanadičnanu amonného: 2,35 g vanadičnanu amonného p.a., NH_4VO_3 se rozpustí ve 400 ml horké vody. Za stálého míchání se pomalu přilévá 20 ml zředěné kyseliny dusičné (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) a objem se doplní vodou na 1 l.

3.7 Standardní roztok 1 mg fosforu na 1 ml: 4,387 g dihydrogenfosforečnanu draselného p.a., KH_2PO_4 se rozpustí ve vodě a objem se doplní na 1 l.

4. **Přístroje**

4.1 Křemenná nebo porcelánová spalovací miska.

4.2 Elektrická muflová pec s termostatem, regulovaná na teplotu 550 °C.

4.3 Kjeldahlova baňka, 250 ml.

4.4 Odměrná baňka a přesná pipeta.

4.5 Spektrofotometr.

4.6 Zkumavky, průměr cca. 16 mm, se zátkou N 14,5; objem: 25 - 30 ml.

5. **Postup**

5.1 *Příprava roztoku*

Podle druhu vzorku se připraví roztok způsobem, který je uveden v bodě 5.1.1 nebo 5.1.2.

5.1.1 *Obvyklý postup*

Do Kjeldahlovy baňky se naváží 1 g nebo větší množství vzorku s přesností na 1 mg. Přidá se 20 ml kyseliny sírové (3.5); baňka se důkladně protřepe, aby se vzorek a kyselina dobře spojily a aby se zabránilo usazování vzorku na stěnách baňky; pak se roztok zahřeje a 10 minut vaří. Po krátkém ochlazení se přidají 2 ml kyseliny dusičné (3.4); slabě se zahřeje a opět trochu ochladí. Pak se opět přidá trochu kyseliny dusičné (3.4), vše se uvede do varu a postup se opakuje tolikrát, až se získá čirý roztok. Potom se zchladí, přidá se trochu vody a tekutina se převede do odměrné baňky o objemu 500 ml, přičemž Kjeldahlova baňka se vypláchne teplou vodou. Po ochlazení se baňka doplní vodou po značku, protřepe a zfiltruje.

5.1.2 *Postup pro vzorky, které obsahují organické látky, ale neobsahují dihydrogenfosforečnan vápenatý a hořečnatý*

Do spalovací misky se naváží přibližně 2,5 g vzorku se s přesností na 1 mg a dokonale se promíchá 1 g uhličitanu vápenatého. V muflové peci se spaluje při teplotě 550 °C ± 5 °C tak dlouho, až se získá popel bílé nebo šedé barvy (malé množství uhlíkatých částic není na závadu). Popel se převede do kádinky o objemu 250 ml, přidá se 20 ml vody a kyselina chlorovodíková (3.2), dokud neustane pěnění; nakonec se přidá dalších 10 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Pak se kádinka postaví na pískovou lázeň a odpaří se do sucha, aby se vyloučily křemičitany. Zbytek se rozpustí v 10 ml kyseliny dusičné (3.3) a 5 minut vaří na pískové lázni tak, aby nedošlo k úplnému vysušení. Tekutina se převede do odměrné baňky o objemu 500 ml, přičemž kádinka se vícekrát vymyje horkou vodou. Po ochlazení se směs doplní vodou po značku, promíchá a zfiltruje.

5.2 *Vývoj zbarvení a měření extinkce*

Alikvotní množství filtrátu připraveného podle bodu 5.1.1 nebo 5.1.2 se zředí tak, aby obsahovalo koncentraci fosforu maximálně 40 µg/ml. 10 ml tohoto roztoku se odpipetuje do zkumavky (4.6) a přidá se 10 ml molybdátovanadátového činidla (3.6). Protřepe se a nechá se stát minimálně po dobu 10 minut při teplotě 20 °C. Pak se měří extinkce ve spektrofotometru při 430 nm proti roztoku z 10 ml vody a 10 ml molybdatovanadátového činidla (3.6).

5.3 *Kalibrační křivka*

Ze standardního roztoku (3.7) se připraví roztoky, které obsahují 5, 10, 20, 30 a 40 µg fosforu na jeden ml. Ke každým 10 ml těchto roztoků se přidá 10 ml molybdátovanadátového činidla (3.6). Protřepe se a nechá se stát minimálně po dobu 10 minut při teplotě 20 °C. Pak se měří extinkce za podmínek uvedených v bodě 5.2.

Kalibrační křivka se vytvoří vynesením hodnot extinkcí proti odpovídajícím množstvím fosforu. Křivka je lineární pro koncentraci fosforu 0 - 40 µm/ml.

6. **Výpočet výsledků**

Obsah fosforu ve zkoušeném vzorku se zjišťuje pomocí kalibrační křivky.

Výsledek se vyjadřuje v procentech.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku:

nesmí u vzorků s obsahem fosforu nižším než 5 % překročit hodnotu 3 % relat.,

u vzorků s obsahem 5 % fosforu a vyšším 0,15 % abs.

IV. **STANOVENÍ OBSAHU TUKU**

1. **Účel a rozsah**

Metoda umožňuje stanovení obsahu tuku v krmivech. Nevztahuje se na zkoušení olejnatých semen nebo olejnin ve smyslu nařízení Rady č. 136/66/EHS ze dne 22. září 1966. Stanovení obsahu oleje v těchto výrobcích je stanoveno v příloze V nařízení Komise č. 1470/68 ze dne 23. září 1968.

Podle druhu krmiva může být použit jeden ze dvou následujících postupů.

1.1 *Postup A*: (extrakce éterem): použije se na všechna krmiva s výjimkou těch, která jsou uvedena v bodě 1.2.

1.2 *Postup B*: použije se pro krmiva, ze kterých nemůže být tuk zcela extrahován diethyletherem bez předchozí hydrolýzy, krmiva živočišného původu, lepky, sušenou bramborovou pulpa, sušené pivovarské a lihovarské mláto, zbytky sušenek a chleba, vařené kuchyňské odpady, sušené kvasnice, mléčné výrobky, jakož i pro krmné směsi s vysokým obsahem těchto produktů (minimálně 40 %) a krmné směsi obohacené tukem.

2. **Princip**

2.1 *Postup A*: Tuk se extrahuje diethyletherem. Extrakční činidlo se oddestiluje a zbytek se vysuší a zváží.

2.2 *Postup B*: Vzorek se hydrolyzuje za horka kyselinou chlorovodíkovou. Roztok se zchladí a zfiltruje. Promytý a usušený zbytek se extrahuje diethyletherem podle postupu A.

3. **Chemikálie**

3.1 Diethylether, bez obsahu vody, ρ: 0,720, b.v.: 43,5 °C, prakticky neobsahující peroxidy.

3.2 Síran sodnýbezvodý p.a.

3.3 Kyselina chlorovodíková 3N.

3.4 Filtrační prostředek, např. křemelina/infuzoriová hlinka, hyflo-supercel.

3.5 Chlorid uhličitý p.a.

4. **Přístroje**

4.1 Soxhletův extrakční přístroj nebo jiný rovnocenný přístroj.

4.2 Topné zařízení s regulací teploty a s ochranou proti výbuchu.

4.3 Vakuová laboratorní sušárna (tlak nižší než 100 torrů).

5. **Postup**

5.1 *Postup A: (viz poznámky 7.1)*

Odváží se 5 g vzorku s přesností na 1 mg a smíchá se s 2 až 3 g (v případě potřeby i více) bezvodého síranu sodného. Směs se vloží do tukuprosté extrakční patrony a uzavře se tukuprostou zátkou z vaty. (Promíchání vzorku se síranem lze provést i v patroně.)

Patrona se vloží do extrakčního přístroje (4.1) a extrahuje se po dobu 6 hodin diethyletherem (3.1). V případě použití Soxhletova extrakčního přístroje se topení nastaví tak, aby minimálně 15 krát za hodinu došlo k přetoku extrakčního činidla. Etherový extrakt se zachycuje do suché, předem zvážené laboratorní baňky, do níž se vloží několik kousků pemzy ([1]).

Diethylether se oddestiluje a zbytek se suší následující hodinu a půl ve vakuové laboratorní sušárně (4.3) při teplotě 75 °C. Po ochlazení v exsikátoru se zváží. Potom se suší dalších 30 minut, aby se zjistilo, zda váha tuku zůstává konstantní (ztráta hmotnosti musí být nižší než 1 mg).

5.2 *Postup B*

Do kádinky o objemu 400 ml nebo Erlenmeyerovy baňky o objemu 300 ml se naváží 2,5 g vzorku (viz poznámky 7.2) s přesností na 1 mg. Pak se přidá 100 ml 3 N kyseliny chlorovodíkové (3.3) a několik kousků pemzy. Kádinka se zakryje hodinovým sklíčkem resp. Erlenmeyerova baňka se opatří zpětným chladičem. Směs se na malém plameni nebo na zahřívací desce uvede do lehkého varu a takto udržuje 1 hodinu. Je nutno zabránit usazování částeček na stěnách nádoby.

([1]) Pokud má být tuk dále kvalitativně analyzován, je nutno kousky pemzy nahradit skleněnými perlami.

Pak se směs ochladí a přidá se takové množství filtračního prostředku (3.4), aby při filtraci nedošlo k úbytku tuku. Filtruje se přes vlhký odtučněný dvojitý filtrační papír. Zbytek na filtru se promývá studenou vodou, pokud nevymizí kyselá reakce. Pak je nutno zkontrolovat, zda filtrát neobsahuje tuk. V případě výskytu tuku ve filtrátu je zřejmé, že před hydrolýzou je nutno provést předextrakci vzorku pomocí diethyletheru postupem uvedeným v bodě 5.1.

Dvojitý filtr se zbytkem se položí na hodinové sklíčko a suší jeden a půl hodiny při teplotě 95 až 98 °C v laboratorní sušárně.

Dvojitý filtr s vysušeným zbytkem se umístí do extrakční patrony a extrahuje diethyletherem podle bodu 5.1, druhý odstavec.

6. **Výpočet výsledků**

Výsledek se vyjadřuje v procentech.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 0,3 % tuku.

7. **Poznámky**

7.1 U výrobků s vysokým obsahem tuku, které se těžko rozemílají a nebo které nejsou vhodné pro odběr redukovaného homogenního vzorku, se postupuje následovně: Naváží se 20 g vzorku s přesností na 1 g a smíchají se s 10 g nebo více bezvodého síranu sodného (3.2). Pak se směs extrahuje diethyletherem, jak je uvedeno v bodě 5.1. Vzniklý extrakt se dolije chloridem uhličitým (3.5) na objem 500 ml a promíchá. Z roztoku se odebere 50 ml do malé, suché a předem zvážené laboratorní baňky s několika zrníčky pemzy ([1]). Extrakční činidlo se oddestiluje a zbytek se vysuší a dále se postupuje podle bodu 5.1 poslední odstavec. Ze zbytku po extrakci v patroně se odstraní extrakční činidlo a rozemele na částice velikosti 1 mm. Potom se vrátí do extrakční patrony (síran vápenatý se nepřidává) a extrahuje se diethyletherem; a dále se postupuje způsobem uvedeným v bodě 5.1, druhý a třetí odstavec.

Výsledek se zjišťuje s ohledem na alikvotní část při první extrakci a vyjadřuje se v procentech vzorku takto:

$$(10\,a + b) \times 5$$

kde:

a = etherový extrakt po první extrakci v alikvotní části v gramech,

b = etherový extrakt po druhé extrakci v gramech.

7.2 U výrobků s nízkým obsahem tuku, je možno zvýšit navážku na 5 g.

([1]) Pokud má být tuk dále kvalitativně analyzován, je nutno kousky pemzy nahradit skleněnými perlami.